

Untersuchungen über die Züchtung
des Vaccinevirus
im exembryonierten Hühnerbrutei

Fritz Linsenmaier

Aus dem Institut für Infektions- u. Tropenmedizin der Universität München

Vorstand: Professor Dr. A. H e r r l i c h

vorgelegt vom Tierhygienischen Institut der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Vorstand: Professor Dr. A. M e y n

Untersuchungen über die Züchtung des Vaccinevirus

im exembryonierten Hühnerbrutei



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Fritz Linsenmaier
aus
Plochingen

München 1958

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. K. Z i p f

Referent: Professor Dr. A. M e y n

Tag der Promotion: 26. Februar 1958

Inhaltsübersicht

	Seite:
I. Einleitung	1
II. Schrifttum	2
III. Eigene Untersuchungen	5
A. Material und Methoden	5
1. Virusstamm	5
2. Eimaterial und Vorbebrütung	5
3. Exembryonierung	5
4. Herstellung der Nähr- und Spülflüssigkeit	7
a) Tyrode-Lösung	7
b) Pferdeserum	7
c) Amnionflüssigkeit	7
d) Hanks-Lösung 96%-Rinder Serum 2% und 2% einer 5%igen Laktalbuminhydrolysat-Lösung	7
e) Hühnerembryonalextrakt 10%-RAF 70% und Pferdeserum 20%	8
5. Infektion, Nachbebrütung und Probeentnahme	8
6. Apparatur	9
7. Virustitrierungen	13
8. Bakteriologische Prüfung	13
IV. Ergebnisse	14
1. Infektion mit der Spülflüssigkeit	14
2. Infektion 12 Stunden vor der Exembryonierung	16
3. Infektion 82 Stunden vor der Exembryonierung	17
a) Tyrode-Lösung als Spül- und Nährflüssigkeit	19
b) Tyrode-Lösung 90%-Pferdeserum 10% als Spül- und Nährflüssigkeit	20
c) Reine Amnionflüssigkeit als Spül- und Nähr- flüssigkeit	20
d) Rinderamnionflüssigkeit 70%-Pferdeserum 20 % -Hühnerembryonalextrakt als Spül- und Nähr- flüssigkeit	24

e) Hanks-Lösung 96% - Rinderserum 2% - und 2% einer 5%igen hydrolysierten Laktalbumin- lösung als Spül- und Nährflüssigkeit	26
V. Besprechung der Ergebnisse	29
VI. Zusammenfassung	31
VII. Literatur	32
Lebenslauf	34

I. Einleitung

Für die Züchtung von Viren verwendet man Versuchstiere, Gewebekulturen und bebrütete Hühnereier. Es gibt Viren mit einem breiten Wirts- und Zellspektrum, die sich in allen drei Verfahren züchten lassen. Andere wiederum können nur in bestimmten Wirten oder Zellsystemen kultiviert werden und schließlich existiert noch eine Reihe von Viren, deren künstliche Vermehrung bisher nicht gelang.

Die Züchtung von Vaccinevirus ist verhältnismäßig einfach und in den verschiedensten Zellen und Wirten möglich. Neben dem Versuchstier eignet sich besonders gut der Hühnerembryo mit seinen außerembryonalen Anhängen.

Seit jeher ist das Vaccinevirus als Modellvirus zur Klärung der verschiedensten Fragen der Virusforschung herangezogen worden. Im Vordergrund stand das Problem der Virusvermehrung und das Virus-Wirtssystem, die sich beide auf einfachste Weise gut an der Chorioallantoismembran des bebrüteten Hühnerembryos studieren ließen.

In jüngster Zeit wurde nun ein Verfahren entwickelt, mit dem es möglich ist, Untersuchungen auch an isolierten Chorioallantoismembranen durchzuführen. Die bebrüteten Hühnereier werden so weit exembryoniert, daß nur noch die dicht an der Eischale haftende Chorioallantoismembran zurückbleibt. Durch geeignete Nährmedien hält man sie über längere Zeit am Leben. Mit exembryonierten Hühnereiern hat man bisher nur bei der Influenza-Gruppe Erfahrungen gesammelt. Es ist Aufgabe dieser Arbeit zu untersuchen, wie weit sich diese Methode auch für die Züchtung von Vaccinevirus eignet.

II. S c h r i f t t u m

Die Viruszüchtung im bebrüteten Hühnerei ist seit ihrer Einführung durch W O O D R U F F und G O O D P A S T U R E (1) ein unentbehrliches Hilfsmittel in der Virusforschung. Der Hühnerembryo und seine Anhangsorgane stellen den lebenden Nährboden für die Züchtung und für den Nachweis vieler Virusarten dar.

Der Hühnerembryo hat gegenüber kleinen Laboratoriumstieren verschiedene Vorzüge. Er ist mehr als andere Wirte frei von latenten Infektionen. Es fehlt ihm die Fähigkeit zur Antikörperbildung, die eine Virusvermehrung stören kann. Er stellt ein billiges und in jedem Laboratorium ohne besondere Schwierigkeiten zu haltendes, lebendes Medium dar. Das Virus kann in ihm ohne Gefahr bakterieller Verunreinigungen gezüchtet werden. Er enthält Gewebe aller drei Keimblätter. Untersuchungen mit ihm lassen sich auf breiter, statistisch gesicherter Basis durchführen.

Von den embryonalen und außerembryonalen Organen des Hühnerembryos ist die Chorioallantoismembran das bevorzugte Gewebe in der Viruszüchtung. Ihre Beimpfung erfolgt gewöhnlich am 10. bis 12. Entwicklungstage des Embryos. In jüngster Zeit entwickelte B E R N K O P F (2) eine Methode, mit der es möglich ist, die Chorioallantoismembran auch im isolierten Zustande der Viruszüchtung nutzbar zu machen. Er entfernte hierfür aus dem bebrüteten Hühnerei alle für die Virusvermehrung unwesentlichen Gewebe einschließlich des Embryos und ließ nur die an der Schalenhaut haftende Chorioallantoismembran zurück. Damit erhielt er eine von der Natur gelieferte, einfache Gewebekultur.

Um die Ernährung der Chorioallantoismembran noch nach der Entnahme des Embryos und Dottersackes zu ermöglichen und die Zellen über längere Zeit funktionsfähig zu erhalten, beschickte Bernkopf das exembryonierte Ei mit einer geeigneten Nährflüssigkeit, der das Virus beigegeben war. Als Verschuß diente eine Gummikappe. In Anlehnung an die in der Gewebezüchtung gebräuchliche "Roller-Tube-Method" wurden die Eier dann auf einer Drehscheibe langsam bewegt, so daß die Membranen gleichmäßig mit Nährflüssigkeit und Impfmateriel bespült und wieder belüftet wurden. Die Neigung der Drehscheibe ist dabei vom Füllungszustand der Eier abhängig. Durch diese Anordnung gelang es, die Stoffwechselprodukte aus der unmittelbaren Umgebung des Gewebes zu entfernen und die Zellen gleichmäßig mit Virus zu infizieren. Die Virusvermehrung kann-

te durch laufende Entnahmen aus der Spülflüssigkeit geprüft werden. Als erstes Virus ist nach dieser Methode das Influenzavirus gezüchtet worden. Es vermehrte sich ähnlich wie nach Beimpfung des Allantoissackes des Hühnerembryos.

Die Vorzüge des Verfahrens von Bernkopf liegen einmal in diagnostischer Hinsicht. Es lassen sich wesentlich größere Mengen Infektionsmaterial verimpfen als bei den üblichen Bruteiimpfungsmethoden. Infolge des fehlenden Eiweißgehaltes empfiehlt sich diese Züchtungsmethode ferner zur Impfstoffgewinnung. Die nach der Vermehrung in den Chorioallantoiszellen in das Spülmedium abgegebenen Viren sind in einer zell- und proteinfreien Flüssigkeit suspendiert, in die während der Versuchsdauer nur geringe Mengen Eiweiß und Zelltrümmer gelangen. Hieraus lassen sich Viruspartikelchen "reiner" gewinnen als aus dem embryonalen Gewebe oder aus der Allantois- bzw. Amnionflüssigkeit. Vielleicht besitzen in der Kultur im exembryonierten Hühnerei hergestellte Impfstoffe einen geringeren Sensibilisierungseffekt als die üblichen Impfstoffe aus dem intakten Hühnerembryo. Die Viruspräparationen für elektronen-mikroskopische, biochemische und serologische Untersuchungen werden durch diese Züchtungsmethode wesentlich erleichtert.

Im Jahre 1950 beschrieb derselbe Autor und später H A N I G und B E R N - K O P F (3, 4) die Virusvermehrung beim Influenzavirus im exembryonierten Brutei. Für besonders geeignet hielten die Kultur im exembryonierten Hühnerei D A N I E L S, E A T O N und P E R R Y (5) zur Prüfung vermehrungsfördernder und -hemmender Substanzen.

Nach E A T O N (6) ist dieses Verfahren 1952 auch zur Bearbeitung chemotherapeutischer Fragestellungen brauchbar. Sein Modell war das Influenzavirus. Er untersuchte in exembryonierten Hühnereiern die Wirkung verschiedener Stoffe auf die Virusvermehrung. Die Untersuchungen bezogen sich vor allem auf Glukose und Dinitrophenol. Es gelang ihm ferner mit Hilfe dieser Methode den Sauerstoffverbrauch des Chorioallantoisgewebes zu bestimmen.

S I E G E R T, M A N N W E I L E R und O L D E N B U R G (7) beschrieben ihre Erfahrungen mit der Viruszüchtung im exembryonierten Brutei im Jahre 1954. Als Modelle dienten ihnen Newcastle- und Influenzaviren. Sie verbesserten Bernkopf's Methode und untersuchten die Vermehrungsfähigkeit dieser Viren.

Auch S C H Ä F E R und M U N K (8) bedienten sich dieser Technik. Im Vordergrund ihrer Arbeiten standen vor allem Fragen der Latenzzeit und der Bil-

dung löslicher Antigene und Hämagglutinine bei Geflügelpestviren. Sie empfahlen die Kultur für elektronenmikroskopische Untersuchungen.

S I E G E R T und Mitarbeiter (7) wiesen auf die Abhängigkeit des Hämagglutinationstiteranstieg vom Funktionszustand der Membranzellen des exembryonierten Hühnereis nach der Infektion mit Newcastleviren hin.

G R E U E L (9) untersuchte die Vermehrungsfähigkeit des Newcastlevirus in der Kultur im exembryonierten Hühnerei. Er hält diese Methode zur Diagnose der atypischen Geflügelpest für geeignet. Greuel sieht die Vorzüge besonders darin, daß sich in der Kultur im exembryonierten Brutei frühzeitig ein Viruswachstum feststellen läßt.

Die Nachkultur im exembryonierten Brutei eignete sich nach den Untersuchungen von S P R Ö S S I G (10) auch für die Austestung der Neutralisationswirkung typenspezifischer Meerschweinchenserum gegen Influenzastämme. Von Vorteil ist hierbei das quantitative Arbeiten bei klaren und übersichtlichen Versuchsverhältnissen und die Schnelligkeit, mit der ein Ergebnis bei relativ geringem Materialaufwand erzielt werden kann. So ließ sich zeigen, daß der Neutralisationstest zur Klärung einer speziellen Fragestellung im exembryonierten Hühnerei im Gegensatz zum Tierversuch schnell und komplikationslos durchgeführt werden kann.

Die "Eklipse" beim Herpesvirus verfolgte W I L D Y (11). Es gelang ihm ein klares Bild über den Infektionsablauf zu geben. Neutralisationsversuche veranschaulichten seine Beobachtungen.

B U R N E T und L I N D (12) verbesserten 1954 das Züchtungsverfahren im exembryonierten Hühnerbrutei. Neben der Chorioallantoismembran verwendeten sie auch das viszerale Blatt, also das innere Blatt der Allantois und das Amnion mit für die Kultur. Es gelang ihnen mit der Erweiterung dieser Methode bei den Influenzaviren doppelt so hohe Infektionstiter zu erzielen.

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methoden

1. Virusstamm

Die Versuche sind mit dem eiadaptierten Dermovaccinestamm CVA durchgeführt worden. Das Ausgangsvirus stellte die dritte bis achte Eimembranpassage dar. Die biologischen Eigenschaften haben H E R R L I C H und M A Y R (13) beschrieben.

2. Eimaterial und Vorbebrütung

Die Bruteier stammten vom "Weißen Leghorn" aus einer seuchenfreien Geflügelfarm. Die Legehennen waren nicht gegen Geflügelpocken schutzgeimpft. Die Vorbebrütung fand im Flächenbrüter des Brutapparates, Modell "EHRET" statt. Die Bruttemperatur lag zwischen $38,0^{\circ}$ - $38,5^{\circ}$ C. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 65%.

3. Exembryonierung

Die Hühnereier wurden bei $38,0^{\circ}$ - $38,5^{\circ}$ C im Schrankbrüter 14 bis 16 Tage vorbebrütet und täglich geschielet. Es wurden nur Eier verwendet, bei denen am 14. bis 16. Tag die Chorioallantoismembran zum Sack geschlossen war.

Am Impftag markiert man mit Hilfe einer Schierlampe den unteren Rand der Luftkammer und trägt nach der Desinfektion mit Jod die Schalenkappe über der Luftkammer 2 - 3 mm oberhalb der Markierungslinie mit einer sterilen, gebogenen Schere ab. Ein unangenehmes Splintern der Eischale wird vermieden, wenn man die Schnittlinie mit heißem Paraffin bestreicht. Nach dem Abtragen des stumpfen Poles wird der freigelegte Boden der Luftkammer bis in Höhe des Überstehenden Schalenrandes sorgfältig mit erwärmtem, verflüssigtem Paraffin ausgegossen. Das Ei bewegt man dabei rotierend, damit sich das Paraffin gleichmäßig verteilen und eine 1 - 2 mm dicke Schicht bilden kann. Das Paraffin darf nicht zu heiß aufgetragen werden, sonst löst sich die Chorioallantoismembran von der Schalenhaut ab, was unbedingt vermieden werden muß. Ist das Paraffin hart geworden, so schneidet man mit einem sterilen Starmesser eine 1 - 2 markstückgroße Öffnung in der Mitte

aus dem Paraffinboden heraus. Es bleibt ein schmaler Ring zurück, der eng mit der Eischale verbunden an der Chorioallantoismembran praktisch aufgehängt ist. Dieser Ring verhindert, daß beim Exembryonieren die Chorioallantois mit austritt. Vor dem Exembryonieren ist es günstig, aus der eröffneten Allantoishöhle das Harnwasser mit einer Pipette abzusaugen und dann das Amnion zu eröffnen. Der Embryo soll beim Exembryonieren zuerst durch das Loch im Paraffinboden austreten. Unter drehenden Bewegungen kippt man das Ei weiter und es folgen dann Dotter und Eiweißsack. Gleichzeitig werden die Allantoissepten und die Übergangszone durchtrennt. Es empfiehlt sich die Septen nicht am Chorioallantoissack, sondern ganz nahe am Übergang zum inneren Allantoisblatt abzuschneiden. Ist vollständig exembryoniert und sind die Bindungen zwischen äußerem und innerem Allantoisblatt richtig und vor allem rechtzeitig zerschnitten worden, so bleibt die Chorioallantoismembran als Sack dicht an der Eischale haftend zurück. Das Innere wird dreimal mit kühler, steriler, physiologischer Tyrode-Lösung ausgewaschen, um alle noch im Chorioallantoissack verbliebenen Reste von Dotter, Eiweiß und Blut zu entfernen.

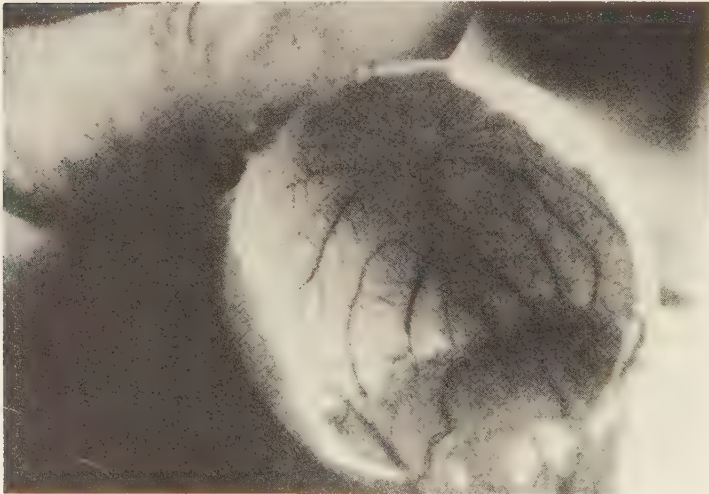


Abb.1. 15.Bebrütungstag. Die zum Sack geschlossene Chorioallantoismembran.

Anschließend stellt man das Ei mit der Öffnung nach unten in eine mit sterilem Filterpapier ausgelegten Petrischale und läßt die Spülflüssigkeit vollständig ablaufen.

4. Herstellung der Nähr- und Spülflüssigkeit

Folgende Nährflüssigkeiten standen uns zur Verfügung:

a) Tyrode-Lösung

Die Tyrode-Lösung wurde nach der Methode von Hallmann wie folgt hergestellt und zur Entkeimung durch Seitz-E K S - Filter filtriert.

NaCl	8,00 g	NaH_2PO_4	0,05 g
KCl	0,20 g	NaHCO_3	1,00 g
CaCl ₂	0,20 g	Dextrose	1,00 g
MgCl ₂	0,10 g	Aqua dest.	1000,00 g

Die Wasserstoffionenkonzentration wurde mit dem elektrischen Ionometer auf 7,4 eingestellt.

b) Pferdeserum

Das Blut wurde einem gesunden Pferde aus der Vena jugularis entnommen und in einem hohen Standzylinder aufgefangen. Der Zylinder kam in den Eisschrank und blieb dort 2 bis 3 Tage stehen. Das freie Serum wurde mit einer Pipette von Zeit zu Zeit abgesaugt und steril filtriert. Das Pferdeserum wurde mit der Tyrode-Lösung im Verhältnis 1:10 verdünnt.

c) Amnionflüssigkeit

Diese Nährflüssigkeit wurde aus 10 bis 15 Wochen trächtigen Rinderuteri steril entnommen und ihr pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

d) Hanks-Lösung 96%-Rinderserum 2% u. 2% einer 5%igen Laktalbuminhydroly-

sat-Lösung

Die Zusammensetzung der Hanks-Lösung war folgende:

NaCl	8,00 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,06 g
KCl	0,40 g	KH_2PO_4	0,06 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,10 g	Glukose	1,00 g

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,10 g	Aqua bidest. 1000,00 g
CaCl_2	0,14 g	

Die Salze wurden nacheinander quantitativ in Aqua bidest. aufgelöst und zu je 40 ml dieser Lösung 1 ml einer 1,4%igen (isotonischen) Natriumbikarbonatlösung (NaHCO_3) zugesetzt. Zu dieser Hanks-Lösung kam eine 5%ige hydrolysierte Laktalbuminlösung. 5 g Laktalbuminhydrolysat wurden in 100,0 ml der obigen Lösung bei 56° C im Wasserbad aufgelöst, anschließend bei 3000 Umdrehungen eine halbe Stunde zentrifugiert und der Hanks-Lösung soviel zugesetzt, daß der Gesamtanteil der 5%igen Laktalbumin-Lösung 2% betrug.

Nach einem Zusatz von 2 % Rinderserum wurde die Nährlösung durch Seitz-Klär-Schichten vorfiltriert, mit E-K-S-Filter steril filtriert und der pH-Wert auf 7,5 eingestellt.

e) Hühnerembryonalextrakt 10%- Rinderamnionflüssigkeit 70 % und Pferdeserum 20 %

9 Tage vorbebrütete Hühnereier wurden exembryoniert, die Embryonen durch 2-3 maliges Waschen mit steriler Tyrode-Lösung von Blut und anderen Eibestandteilen befreit und im Homogenisator zerkleinert. Diesen Embryonalbrei zentrifugierten wir bei 3000 UpM. eine halbe Stunde lang und verdünnten die überstehende Flüssigkeit mit der gleichen Menge Tyrode-Lösung = Zentrifugat I.

Der Bodensatz wurde mit derselben Menge Tyrode-Lösung, die man zum Verdünnen des Zentrifugates I benötigte, vermischt, eine halbe Stunde bei 37° C bebrütet und bei 3000 UpM. eine halbe Stunde zentrifugiert. Dieser Überstand gab zusammen mit dem Zentrifugat I den fertigen Embryonalextrakt. Nach dem negativen Ausfall der Sterilitätsprobe lagerte man ihn bei - 20° C in kleinen Portionen ab. Vor seiner Verwendung wurde er nochmals bei 3000 UpM. 5 Minuten lang zentrifugiert, um die ausgefallenen Bestandteile zu entfernen.

5. Infektion, Nachbebrütung und Probeentnahme

Die so weit präparierten Bruteier wurden mit 12 - 15 ml der infizierten Spülflüssigkeit beschickt. Zu Anfang wurde als Spülflüssigkeit sterile Tyrode-Lösung verwendet. Aus Sterilitätsgründen wurde vorbeugend pro ml 10 - 15 I.E. Penicillin und 5 - 10 μ Streptomycin beigegeben.

Im Hauptteil der Untersuchungen wurden die Eier 12 Tage bebrütet und 82 Stunden vor dem Exembryonieren in die Allantoishöhle geimpft, weiterbebrütet und dann erst exembryoniert. Nur Eier mit zahlreichen Generalisationshererden auf der Chorioallantoismembran wurden ausgewählt und wie oben angegeben mit steriler, virusfreier Spülflüssigkeit beschickt. Spülflüssigkeiten waren hier Tyrode-Pferdeserum, reine Amnionflüssigkeit, Hanks-Rinderserum-Laktalbuminhydrolysat, Rinderamnionflüssigkeit-Pferdeserum-Hühnerembryonaleextrakt. Auch hier wurde Penicillin und Streptomycin wie oben zugegeben.

Anschließend sind die Eier mit Gummikappen verschlossen worden, deren unterer Rand zur besseren Abdichtung vorher in heißes Paraffin getaucht wurde.

Durch die Mitte der Kappe läuft ein Kapillarrohr, das mit einem Gummistopfen verschließbar ist. Das Kapillarröhrchen reicht 1 - 2 cm durch den Paraffinring ins Eiinnere. Es dient zur laufenden Entnahme der Spülflüssigkeitsproben. Sie werden mit einer dünnen und langen Kanüle und einer Spritze entnommen.

6. Apparatur

In Anlehnung an die in der Gewebezüchtung gebräuchliche "Roller-Tube-Methode" wurden die Eier nach Verschuß mittels Gummikappen auf einer Drehscheibe angeordnet.

Diese Scheibe stand unter einem Neigungswinkel von 45 Grad. Die Umdrehungszahl regelte ein Widerstand außerhalb des Brutraumes. In unseren Versuchen drehte sich die Scheibe achtmal in einer Stunde.

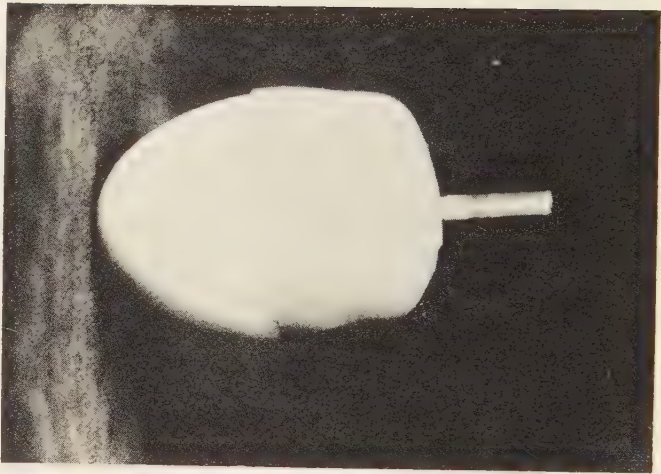


Abb.2

Fertig präpariertes, exembryoniertes Hühnerbrutei, "verschlossen" mit einer Gummikappe, durch die ein dünnes Glasröhrchen für die laufende Entnahme der Spülflüssigkeit eingeführt ist.

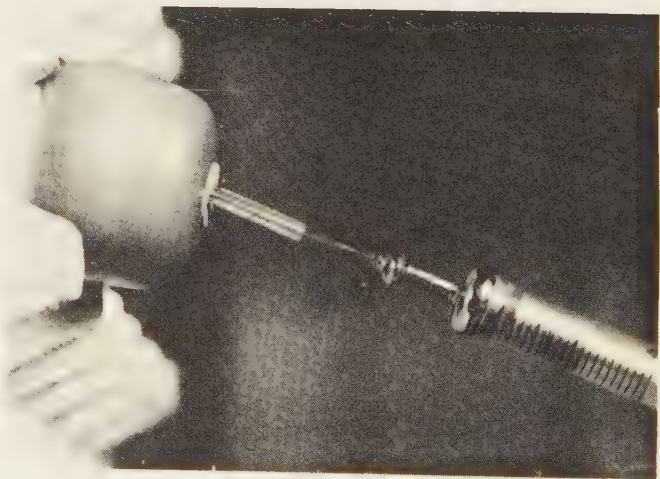


Abb.3.

Materialentnahme aus der Kultur im exembryonierten Hühnerbrutein.

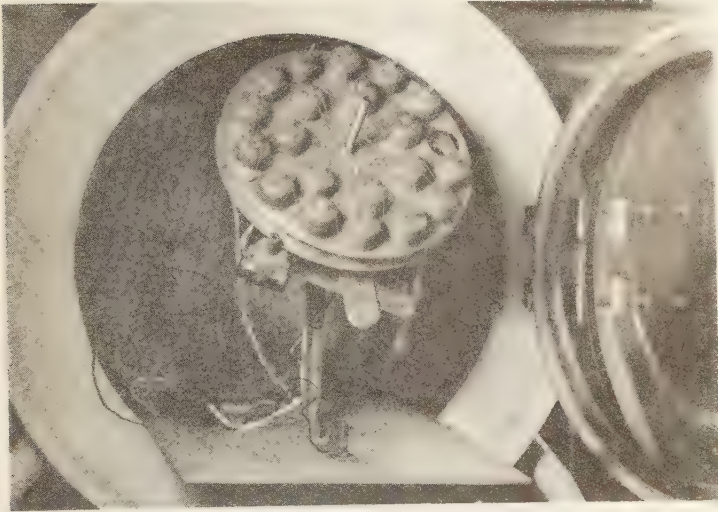


Abb.4. Gesamtansicht einer betriebsfertigen Kultur im exembryonierten Hühnerei.



Abb.5. Direkter Antrieb der Drehscheibe durch einen kleinen Elektromotor. Die Drehscheibe besteht aus zwei dünnen, für die Aufnahmen der Eier entsprechend ausgestanzten Aluminiumblättern. Vorderansicht.

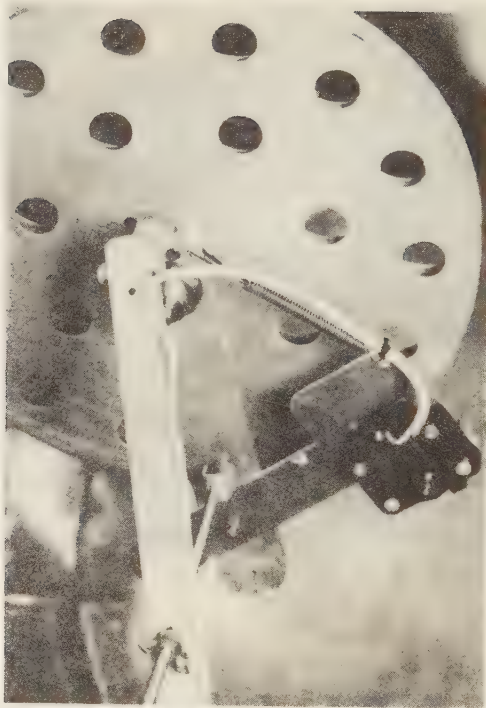


Abb. 6 Befestigung des Elektromotors mittels zweier beweglicher Leichtmetallschenkel. Der an dem einen Schenkel befestigte Motor wird durch die aus der Abbildung zu ersehende Stahlfeder an die Drehscheibe gezogen. Hinteransicht.

Die Apparatur lief in einem Brutschrank mit einer Temperatur von $38,0^{\circ}\text{C}$ – $39,0^{\circ}\text{C}$. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 60 %. Ein kleiner AEG-Elektromotor (S E 1,4 S 50, 535) war an der Drehscheibe befestigt, so daß dessen Achse, mit Gummi überzogen, die Scheibe direkt drehen konnte. Den "Schluß" der Achse des Motors mit der Drehscheibe gewährleistete eine Feder, die zwischen den zwei Schenkeln angebracht war und den einen Schenkel, dem der Motor aufsaß, an die Scheibe zog.

7. Virustitrierungen

Die Auswertung der Spülflüssigkeitsproben erfolgte durch Verimpfung steigender Verdünnungsreihen auf die nicht gesenkte Chorioallantoismembran nach der von H E R R L I C H und M A Y R (14) modifizierten Membranimpftechnik. Der Titer wurde nach der Pockenherdzählung von B U R N E T und F E R I S (15) errechnet.

8. Bakteriologische Prüfung

Jede Stammlösung wurde vor der Verwendung einer bakteriologischen Prüfung unterzogen. Es kamen dabei zweimal je 0,05 ml der Lösung gleichzeitig auf Blutagar, Traubenzuckernährbouillon und Leber-Leberbrühe zur Verimpfung. Die Auswertung geschah nach den üblichen Methoden.

IV. E r g e b n i s s e

1. Infektion mit der Spülflüssigkeit

In zwei orientierenden Vorversuchen wurde die Chorioallantoismembran exembryonierter Hühnereier mit virushaltiger Spülflüssigkeit infiziert. Jede Versuchsreihe bestand aus 10 präparierten Eiern, die nach der Exembryonierung am 15. Bebrütungstag einen geschlossenen und fest an der Eischale haftenden Chorioallantoissack zeigten. Als Spül- und Nährflüssigkeit diente Tyrode-Lösung mit einem Gehalt von 15 I.E. Penicillin und 10 μ Streptomycin pro ml. Eine Chorioallantoismembranverreibung der 8. Passage des Vaccinestammes "Ankara" bildete das Virusausgangsmaterial. Im ersten Versuch enthielt die Tyrode-Lösung 1000 MID, im zweiten Versuch nur 10 MID pro 0,1 ml.

Die Eier wurden auf den "Roller-Tube-Apparat" gestellt. Bei beiden Versuchen wurde dreimal in Abständen von jeweils 24 Stunden p.i. jedem Ei 0,5 ml Spülflüssigkeit entnommen. Die Sammelproben wurden dann auf der Chorioallantoismembran 10 Tage bebrüteter Hühnereier austitriert.

Das Ergebnis beider Versuche ist in Tabelle 1 und Abbildung 7 zusammengefaßt:

Tabelle 1

Probeentnahme nach:	24 ^h	48 ^h	72 ^h
Infektionsdosis			
1000 MID / 0,1 ml	1:80 000	1:10 000	1: 5 000
Infektionsdosis			
10 MID / 0,1 ml	1:2000	1:100	-----

Tabelle 1: Titerergebnisse der 2 Vorversuche.

Über 48 Stunden lang stand 1 ml Impfflüssigkeit im Brutraum bei der gleichen Temperatur. Beim Austitrieren nach dieser Zeit war im Kontrollröhrchen kein Virus mehr nachzuweisen.

Während beim ersten Versuch die Mambranen sich erst am dritten Tag p.i. von

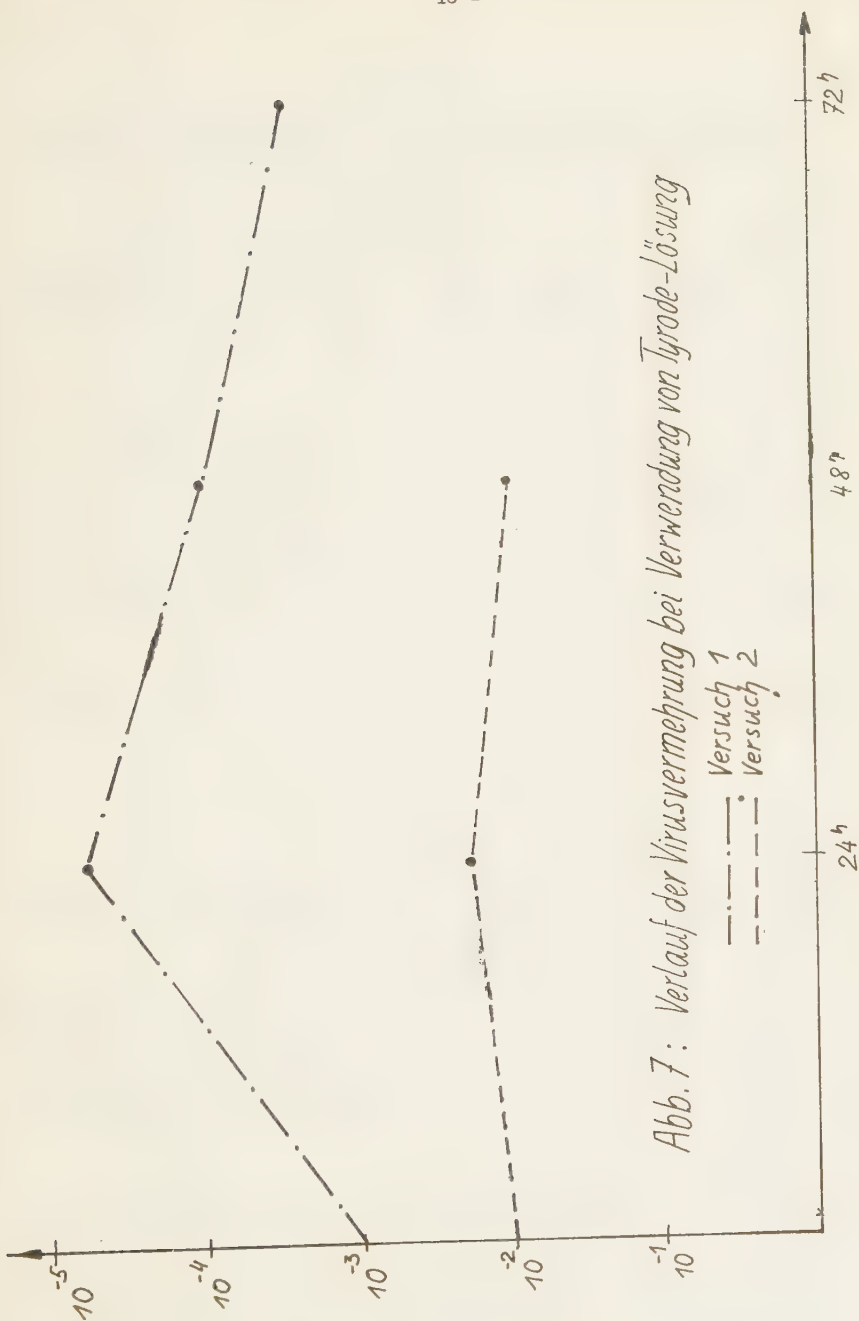


Abb. 7: Verlauf der Virusvermehrung bei Verwendung von Tyrode-Lösung

— · — Versuch 1
- - - Versuch 2

der Schale abzulösen begannen, war dies beim zweiten Versuch trotz der wesentlich niedrigeren Infektionsdosis schon nach 48 Stunden der Fall, so daß nach 72 Stunden von einer Probeentnahme abgesehen werden mußte.

In beiden Versuchen erreichte die Spülflüssigkeit ihren Höchsttiter um 24 Stunden p.i., nach einer Vermehrungsquote um das 80- bzw. 20-fache. Danach fiel der Titer bedeutend ab. Es ist anzunehmen, daß die Chorioallantoiszellen schon frühzeitig abzustarben begannen und sich deshalb die Infektion nicht weiter ausbreiten konnte. Somit war auch der Vermehrung des Vaccinevirus ein Ende gesetzt.

S I E G E R T und Mitarbeiter (7) weisen in ihren Arbeiten mit dem Newcastlevirus ebenfalls auf eine relativ schnelle Verschlechterung der Vermehrungsbedingungen nach der Infektion hin. Nach L A H E L L E und H O R S E F A L L (16) reichen jedoch die nach dem Absterben der Membran verbleibenden lebenden Zellen noch aus, um das Influenzavirus zur Vermehrung zu bringen. Ihre Annahme ist auf den Nachweis von Hämagglutinin aufgebaut.

Für das Vaccinevirus dürften diese Gegebenheiten nicht zutreffen. Wie aus den Versuchen ersichtlich ist, sind lebensschwache Zellen nicht mehr in der Lage, das Vaccinevirus zu synthetisieren.

2. Infektion 12 Stunden vor der Exembryonierung

Anknüpfend an vorige Versuche, bei denen die Infektion der Kultur mit der Nährflüssigkeit erfolgte, versuchten wir in den folgenden zwei Versuchen die Infektion der Kultur um 12 Stunden vorzuverlegen.

Bebrütete Hühnereier wurden am 15. Bebrütungstage, nachdem die Chorioallantois sich geschlossen hatte, je zur Hälfte mit 10 MID und 100 MID in die Allantoishöhle mit demselben Eihautstamm der Versuche 1 und 2 infiziert. 12 Stunden p.i. wurden die Eier exembryoniert. Spezifische Veränderungen an der Chorioallantois waren durch die Schalenöffnung makroskopisch nicht sichtbar.

Je 10 gesunde, kräftig entwickelte Eier, mit gut an der Eischale haftender Chorioallantoismembran beider Infektionsreihen wurden ausgewählt. Sie ergaben die Versuchsreihen 3 und 4.

Die exembryonierten Bruteier wurden mit Tyrode-Lösung beschickt und auf

die Roller-Tube-Apparatur verbracht. Proben von je 0,5 ml Nährflüssigkeit wurden in 10-stündigen Abständen über 40 Stunden lang entnommen.

Das Titrierungsergebnis der Versuche 3 und 4 gibt die Tabelle 2 wieder.

Tabelle 2

Probeentnahme nach:	10 ^h	20 ^h	30 ^h	40 ^h
Infektionsdosis				
10 MID / 0,1 ml	neg.	neg.	neg.	neg.
Infektionsdosis				
100 MID / 0,1 ml	1:100	1:100	1:100	1:100

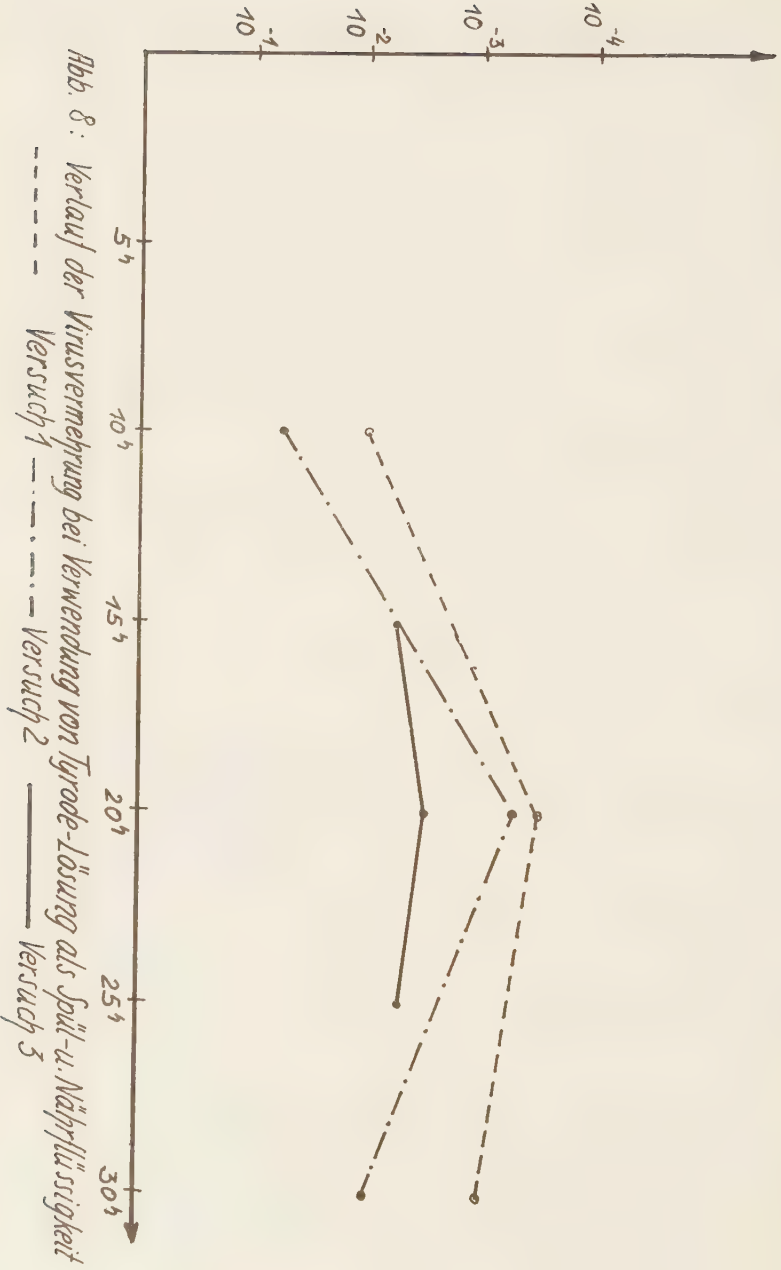
Tabelle 2: Titerergebnisse der Versuche 3 und 4.

Die Titer fielen bei der Infektionsdosis von 10 MID/0,1 ml bei allen Probeentnahmen negativ aus. In der zweiten Versuchsreihe wurde mit einer Animpfdosis von 100 MID/0,1 ml keine Virusvermehrung erreicht.

3. Infektion 82 Stunden vor der Exembryonierung

Die vorhergehenden Versuchsergebnisse gaben Anlaß, die Infektion der Bruteier vor der Exembryonierung zeitlich noch früher vorzunehmen. Deshalb wurden in den folgenden Versuchen 12 Tage bebrütete Hühnereier in die Allantoishöhle infiziert und erst 82 Stunden p.i. exembryoniert. Nach den Arbeiten von H E R R L I C H und M A Y R (13) generalisiert der Vaccine-stamm "Ankara" nach der Verimpfung in die Allantoishöhle des bebrüteten Hühnereies, wenn bei niedrig gewählter Animpfkonzentration die primäre Virusphase überstanden ist, ebenso wie nach Verimpfung auf die Chorioallantoismembran 3-4+. Der Zeitpunkt der Generalisation liegt bei diesem Stamm bei ungefähr 70 Stunden p.i.. Die Embryonen sterben zum Großteil am 2. - 3. Tag der sekundären Virusphase ab.

Nach der Infektion der Bruteier am 12. Bebrütungstag exembryonierten wir die Eier zu dem Zeitpunkt, an dem der Chorioallantoissack fest verschlossen war, die kräftigen Embryonen das Einsetzen der sekundären Virusphase überlebt hatten und ein Einsetzen der Elution aus dem über die ganze Membran verstreuten eng aneinanderliegenden Sekundärherdchen vermutet wurde. Dies war am 15. Tag der Fall. Eier mit deutlich sichtbarer, kräftiger Generalisation



wurden ausgewählt, zu Versuchsreihen zusammengestellt und dann mit verschiedenen Spülmedien beschickt.

a) Tyrode-Lösung als Spül- und Nährflüssigkeit

Aus einer Serie Bruteier, die am 12. Bebrütungstag mit 100 MID infiziert worden waren, wurden 82 Stunden p.i. die überlebenden, gesunden Eier ausgewählt, exembryoniert und Eier mit gut sichtbarer Generalisation (4+) und fest anhaftender Membran zu drei Versuchsreihen zusammengestellt. Als Nährmedium wurde "Tyrode-Lösung" verwendet. In verschiedenen Zeitabständen erfolgten aus den Bruteiern Flüssigkeitsentnahmen, die wie vorher austitriert wurden.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 und Abbildung 8 zusammengestellt.

Tabelle 3

Probeentnahme Std.n.d.Exembryo.	10 ^h	15 ^h	20 ^h	25 ^h	30 ^h
1. Versuch, Titer:	1:100		1:5 000		1:1 000
2. Versuch, Titer:	1:15		1:4 000	1:600	1:100
3. Versuch, Titer:		1:300	1:400	1:300	

Tabelle 3: Übersicht über die Titerergebnisse bei Verwendung von Tyrode-Lösung.

Die höchsten Titer mit Titergipfeln von 4-5 000 wurden in der Zeit von 20 Stunden nach der Exembryonierung erreicht. Innerhalb von 10 Stunden fielen die Titer wieder schnell ab. Sie wurden dann nicht weiter verfolgt. Zu Ende der Versuche hafteten die Mehrzahl der Chorioallantoissäcke noch fest an der Eischale. Die Austitrierung der Sammelproben auf 10 Tage bebrütete Hühnereier mußte unmittelbar nach der Entnahme erfolgen, da sonst durch längere Aufbewahrung der Entnahmeflüssigkeit der Virustiter in reiner Tyrode-Lösung schnell absank.

b) Tyrode-Lösung 90%-Pferdeserum 10% als Nähr- und Spülflüssigkeit

In den nächsten Versuchen wurde als Spülflüssigkeit Tyrode-Lösung mit einem Anteil von 10% Pferdeserum verwendet. 12 Tage bebrütete Hühnereier wurden zu 3 Versuchsgruppen zusammengestellt und mit 100 MID/0,1 ml des Vaccinestammes "Ankara" infiziert. Die Versuchstechnik blieb dieselbe.

Die Titerergebnisse gibt die Tabelle 4 und Abbildung 9 wieder.

Tabelle 4

Probeentnahme Std.n.d.Exembryo.	10 ^h	15 ^h	20 ^h	25 ^h	30 ^h
1. Versuch, Titer:	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
2. Versuch, Titer:	1:1 600	1:6 500	1:8 250	1:5 000	1:1 500
3. Versuch, Titer:	1:40 000	1:40 000	1:400 000	1:3000	1:1 000

Tabelle 4: Übersicht über die Titerergebnisse bei Verwendung von Tyrode-Lösung 90% und Pferdeserum 10%.

Beim ersten Versuch blieben sämtliche Flüssigkeitsentnahmen negativ. Die zweite und dritte Versuchsgruppe ergab aber gute Ergebnisse. Danach fiel der Titer bis zum Absterben der Membranzellen auf 1:1000 zurück.

c) Reine Amnionflüssigkeit als Spül- und Nährflüssigkeit

In einem weiteren Versuchsabschnitt ersetzten wir die Tyrode-Lösung durch reine Amnionflüssigkeit. In vier Versuchsreihen wurden über 50 bebrütete Hühnereier 82 Stunden vor der Exembryonierung mit 500 MID /0,1 ml des Vaccinestammes "Ankara" in die Allantoishöhle infiziert und dann exembryoniert. Auf die Roller-Tube-Apparatur kamen nur solche Eier mit 4+ generalisierter Chorioallantoismembran. Probeentnahmen erfolgten nach 2,6,10,14,18, 22,26,30 und 36 Stunden nach dem Exembryonieren.

Die Ergebnisse dieser 4 Versuche faßt die Tabelle 5 zusammen.

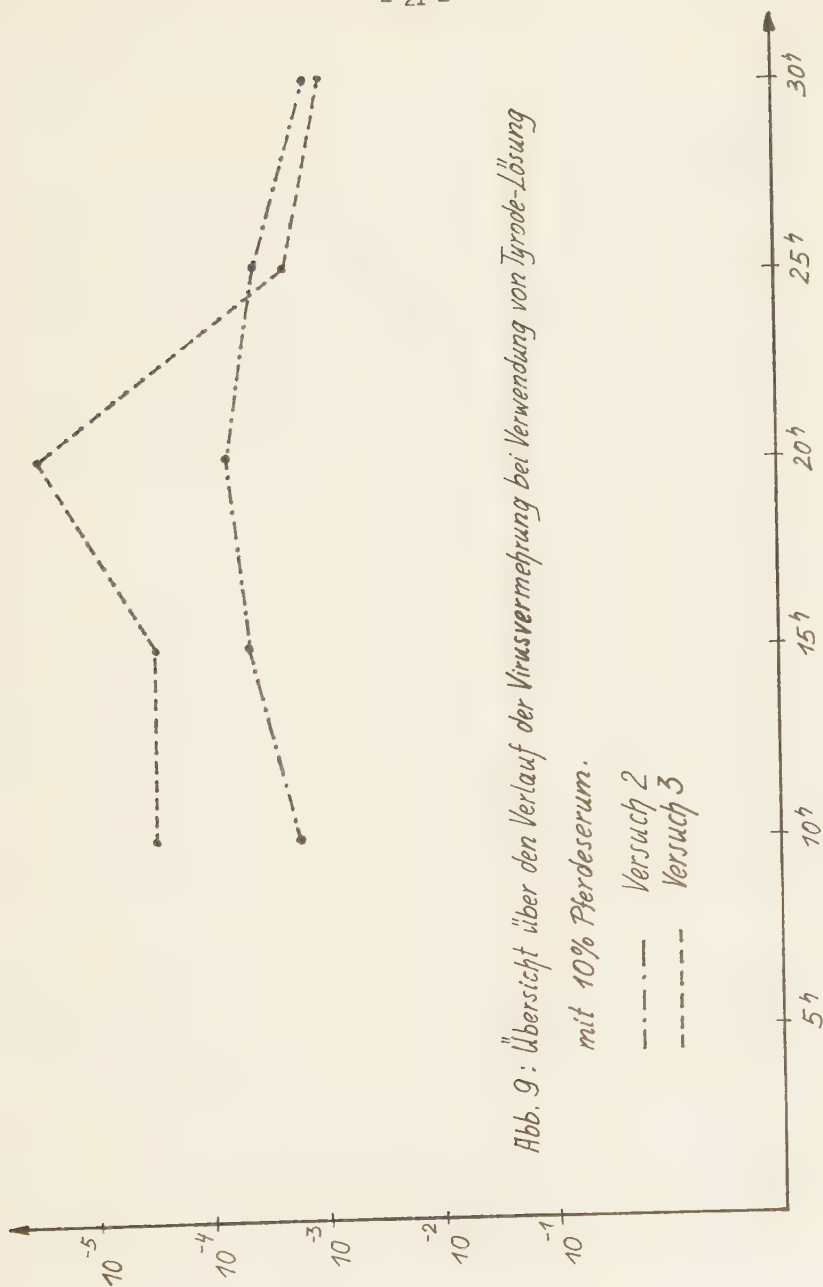


Abb. 9: Übersicht über den Verlauf der Virusvermehrung bei Verwendung von Tyrode-Lösung mit 10% Pferdeserum.

--- Versuch 2
 -.-.- Versuch 3

Tabelle 5

Probeentnahme Std.n.d.Exembry.	2 ^h	6 ^h	10 ^h	14 ^h
1. Versuch, Titer 1:	1000	7000	20 000	70 000
2. Versuch, Titer 1:	10000	13500	30 000	100 000
3. Versuch, Titer 1:	5500	21 000	800 000	200 000
4. Versuch, Titer 1:	---	---	3 000	125 000

Probeentnahme Std.n.d.Exembry.	18 ^h	22 ^h	26 ^h	30 ^h	36 ^h
1. Versuch, Titer 1:	10 000	5 000	40 000	250 000	25 000
2. Versuch, Titer 1:	20 000	10 000	12 000	6 500	1 000
3. Versuch, Titer 1:	150 000	120 000	60 000	27 000	300 000
4. Versuch, Titer 1:1	250 000	—	27 000	3 000	---

Tabelle 5: Übersicht über die Titerergebnisse bei Verwendung von reiner Amnionflüssigkeit.

Der Virusgehalt stieg in der Nährflüssigkeit von der 2. Stunde an und erreichte den Höchstwert von 1: 90 000 14 Stunden nach dem Exembryonieren. Dann nahm der Virusgehalt in der Amnionflüssigkeit laufend ab. Bei 36 Stunden nach dem Exembryonieren lag der Endtiter immer noch bei 1: 34 600.

Einen Überblick über den Verlauf gibt die Abbildung 10. In ihr sind die Mittelwerte der einzelnen Versuchsreihen zusammengestellt.

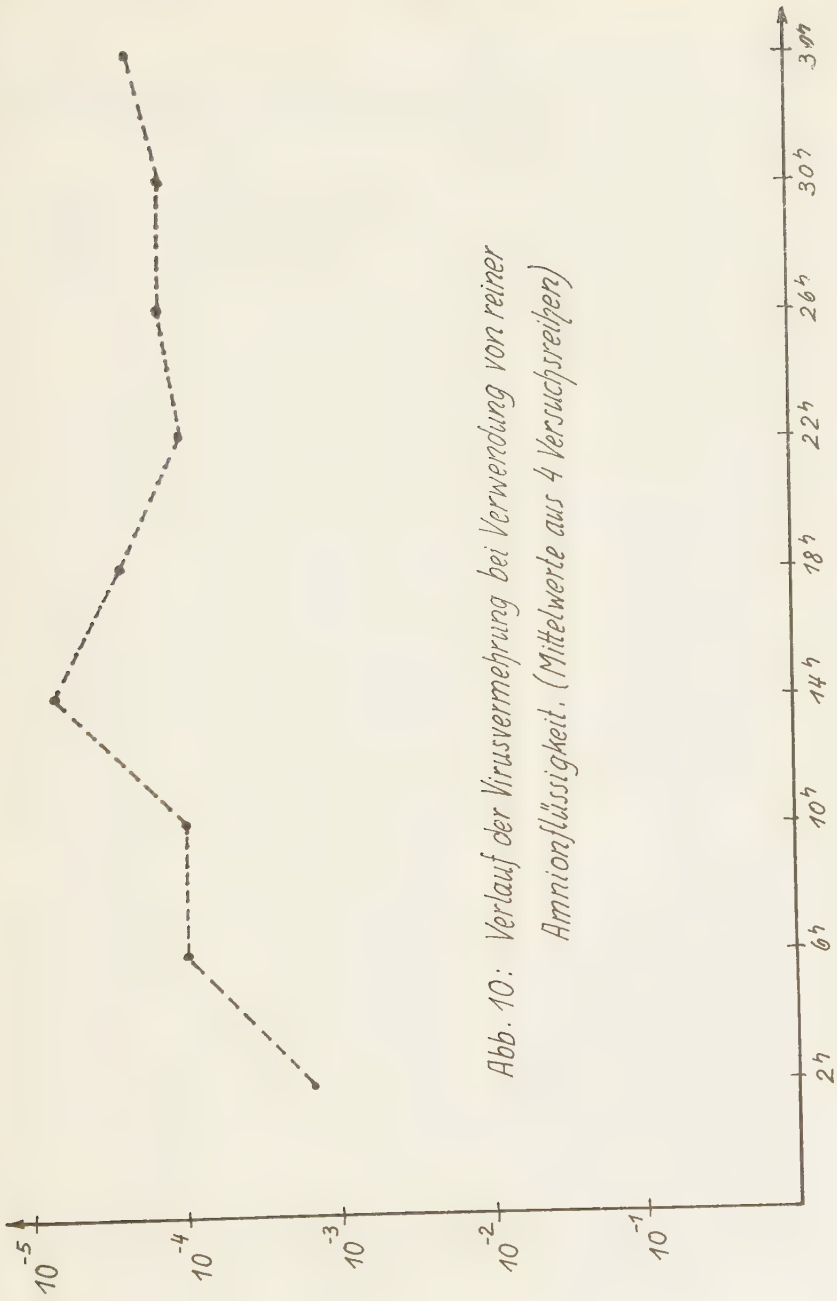


Abb. 10: Verlauf der Virusvermehrung bei Verwendung von reiner Amnionflüssigkeit. (Mittelwerte aus 4 Versuchsreihen)

d) Rinderamnionflüssigkeit 70%-Pferdeserum 20%-Hühnerembryonalextrakt 10%
als Nähr- und Spülflüssigkeit

Weitere vier Versuche wurden mit der angegebenen Spülflüssigkeit durchgeführt. Mit ihr wollten wir eine eventuelle gesteigerte Virusvermehrung und eine Stabilisierung des Vaccinevirus erreichen. Die Versuchstechnik blieb dieselbe. Die Animpfdosis mit dem Vaccinestamm "Ankara" war bei allen vier Versuchen 500 MID/0,1 ml.

Die Ergebnisse bringt die folgende Tabelle 6.

Tabelle 6

Probeentnahme Std.n.d.Exembryo.	2 ^h	6 ^h	10 ^h	14 ^h
1. Versuch, Titer 1:	7 000	25 000	500 000	100 000
2. Versuch, Titer 1:	5 000	30 000	25 000	150 000
3. Versuch, Titer 1:	1 500	3 000	15 000	100 000
4. Versuch, Titer 1:	3 000	7 500	100 000	15 000

Probeentnahme Std.n.d.Exembryo.	18 ^h	22 ^h	26 ^h	30 ^h	36 ^h
1. Versuch, Titer 1:	20 000	10 000	20 000	20 000	15 000
2. Versuch, Titer 1:	40 000	30 000	25 000	5 000	50 000
3. Versuch, Titer 1:	30 000	15 000	20 000	40 000	30 000
4. Versuch, Titer 1:	400 000	30 000	100 000	13 000	9 000

Tabelle 6: Übersicht über die Titerergebnisse bei Verwendung von Rinderamnionflüssigkeit 70%-Pferdeserum 20%- und Hühnerembryonalextrakt 10 %.

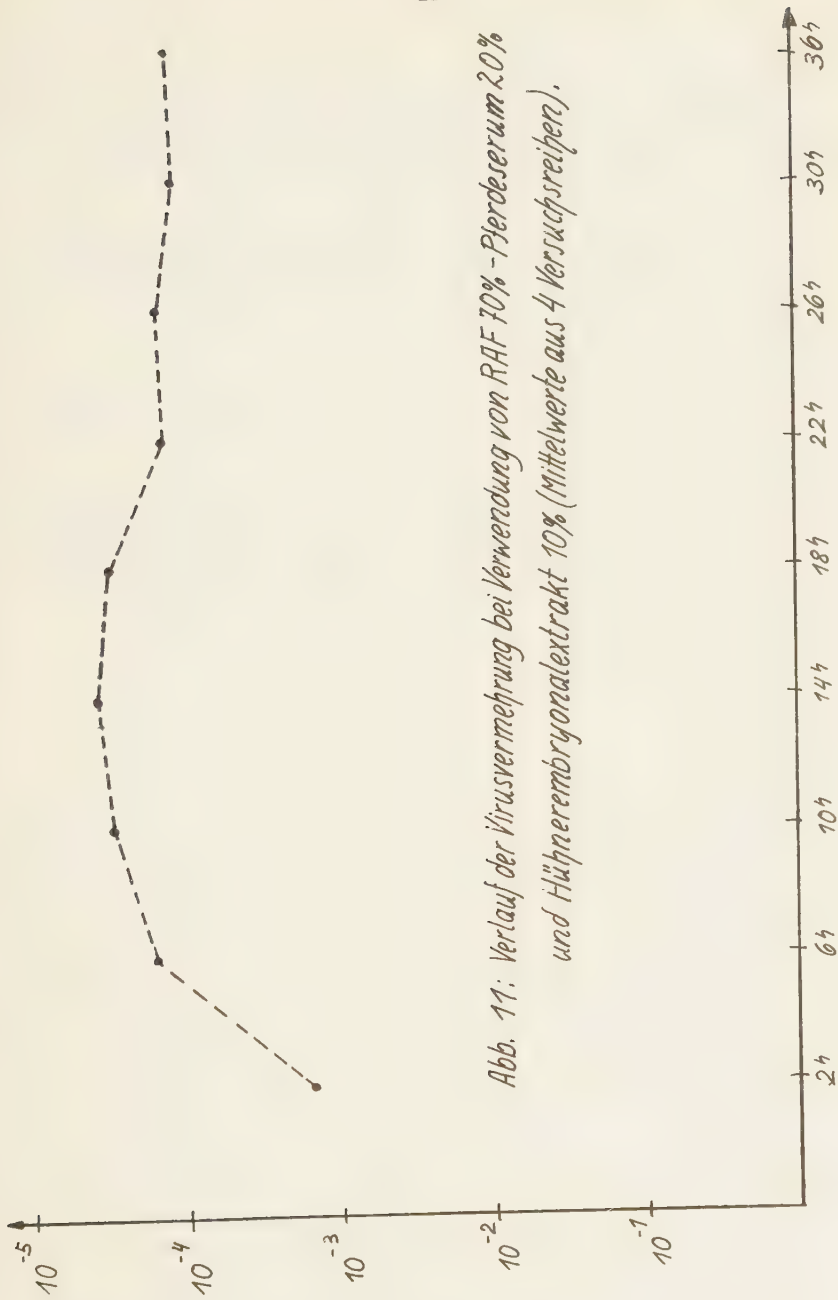


Abb. 11: Verlauf der Virusvermehrung bei Verwendung von RAF 70% - Pferdeserum 20% und Hühnerembryonal-extrakt 10% (Mittelwerte aus 4 Versuchsreihen).

Die Ergebnisse der vier Versuchsreihen verhalten sich übereinstimmend. Die Höchsttiter von 1:50 000 liegen zwischen 10 und 18 Stunden nach dem Ex-embryonieren. Ab 22 Stunden nach der Exembryonierung fiel der Titer laufend bis zum Versuchsende auf 1:15 000 ab.

Einen Überblick über den Verlauf der Titerkurve gibt die Abbildung 11. In ihr sind die Mittelwerte der einzelnen Versuchsreihen zusammengestellt.

e) Hanks-Lösung 96%-Rinder Serum 2%- und 2% einer 5%igen hydrolysierten

 Laktalbuminlösung als Nähr- und Spülflüssigkeit

In den vier Versuchen gebrauchten wir die oben angeführte Nährflüssigkeit. Die Versuchsbedingungen sind die gleichen geblieben. Vier Versuchsgruppen mit 55 Eikulturen wurden nacheinander angesetzt und die Sammelproben aus-
 titriert. Alle Chorioallantoismembranen waren 4+ generalisiert.

Die Tabelle 7 und Abbildung 12 faßt die Ergebnisse zusammen:

Tabelle 7

Probeentnahme Std.n.d.Exembry.	2 ^h	6 ^h	10 ^h	14 ^h	18 ^h
1. Versuch, Titer 1:	2 300	10 000	100 000	200 000	30 000
2. Versuch, Titer 1:	--	10 000	20 000	40 000	3 000
3. Versuch, Titer 1:	1 500	25 000	200 000	50 000	25 000
4. Versuch, Titer 1:	1 000	10 000	50 000	15 000	70 000
Probeentnahme Std.n.d.Exembry.	22 ^h	26 ^h	30 ^h	36 ^h	
1. Versuch, Titer 1:	20 000	10 000	20 000	4 000	
2. Versuch, Titer 1:	25 000	20 000	10 000	---	
3. Versuch, Titer 1:	40 000	150 000	10 000	60 000	
4. Versuch, Titer 1:	10 000	4 500	5 000	20 000	

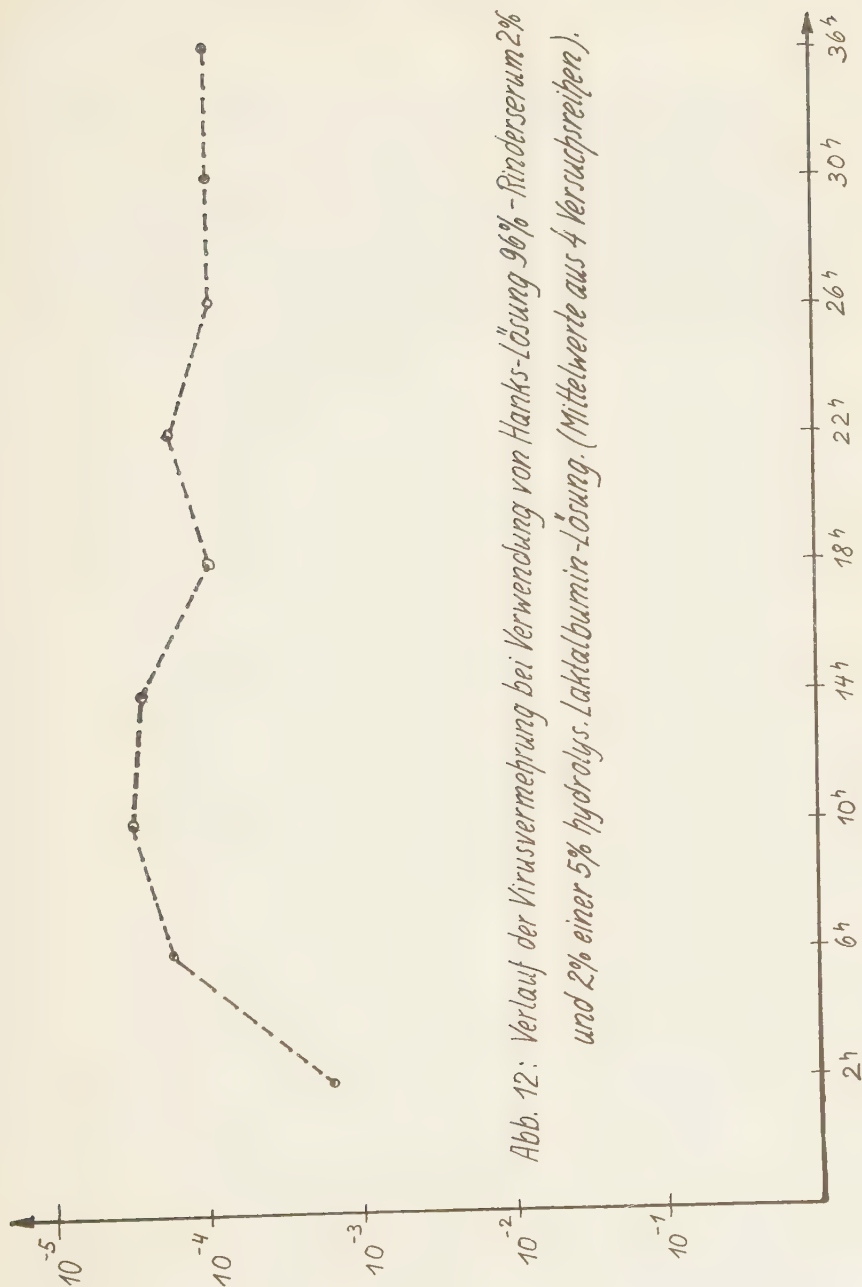


Abb. 12: Verlauf der Virusvermehrung bei Verwendung von Hanks-Lösung 96% - Fetalserum 2% und 2% einer 5% hydrolys. Lakalbumin-Lösung. (Mittelwerte aus 4 Versuchsreihen).

Die Tabelle 7 gibt einen Überblick über die Titerergebnisse bei Verwendung von Hanks-Lösung 96%-Rinderserum 2%- und 2% einer 5%igen hydrolysierten Laktalbuminlösung.

Die Ergebnisse der letzten Versuchsreihen weisen gegenüber den vorhergehenden Titerergebnissen keine erheblichen Unterschiede auf. Der höchste Titer von 1:50 000 wurde in der Zeit zwischen 10 und 14 Stunden erreicht. Anschließend fielen die Titer bis zum Versuchsende auf 1:10 000 ab.

V. Besprechung der Ergebnisse

Die Kultur des exembryonierten Hühnerbruteies stellt in der Viruszüchtung einen Übergang dar zwischen dem bebrüteten Hühnerei und der Gewebekultur. Indem alle für die Viruszüchtung unwesentlichen Bestandteile des Hühnerembryos aus dem Ei entfernt werden und nur die als geschlossener Sack fest an der Eischale haftende Chorioallantoismembran zurückbleibt, erreicht man praktisch eine natürliche Gewebekultur in der Eischale.

Diese Methode wurde erstmals von Bernkopf 1949 angewandt und in der folgenden Zeit von mehreren Autoren in der Virusforschung zur Klärung von Fragen der Virusvermehrung, zur virologischen Grundlagenforschung und auch zur Beantwortung chemotherapeutischer Fragestellungen herangezogen. Die dabei studierten Modellviren waren immer Viren aus der Influenzagruppe, einmal auch das Herpesvirus.

Unsere Aufgabe war es, die Vermehrungsfähigkeit des Vaccinevirus in der Kultur im exembryonierten Brutei zu prüfen. Bei einem positiven Ergebnis ergäbe sich eine weitere Möglichkeit zur Differenzierung der Pockenviren.

In zwei orientierenden Versuchen war die Nährflüssigkeit eine Tyrode-Lösung. Sie wurde mit einer Chorioallantoismembranverreibung des Vaccinestammes "Ankara" der 8. Passage so versetzt, daß ihr Virusgehalt in der Versuchsreihe 1 1000 MID/0,1 ml, in Versuchsreihe 2 10 MID/0,1 ml betrug. Sammelproben, die in gleichmäßigen Zeitabständen entnommen wurden, kamen auf der Chorioallantois des bebrüteten Hühnereies zur Titrierung.

Die Ergebnisse waren schlecht. Versuch 1 erreichte zwar nach 24 Stunden einen Titer von 1:80 000, der aber sehr rasch wieder abfiel. Versuch 2 stieg nicht über 1:200. Hier war die Animpfdosis zu schwach. Entscheidend war vor allem, daß sich im Verlauf des 3. Tages p.i. alle Chorioallantoismembranen von der Eischale ablösten. Postmortale Veränderungen waren erkennbar. Vaccineveränderungen konnten makroskopisch nicht festgestellt werden.

Aus Vorversuchen ist bekannt, daß die Lebensdauer der Chorioallantoismembrankultur ausreicht, um den ganzen Zeitabschnitt des Ablaufes einer Vaccinevirusvermehrung darin unterzubringen. Durch die Infektion tritt aber eine bedeutende Verkürzung der Lebensdauer der Zellen ein. Vor allem verschlechtern sich die Vermehrungsbedingungen schon wenige Stunden nach der Infektion durch die rasche Zunahme lebensuntüchtig werdender Zellen.

Zur Lösung dieser Schwierigkeiten schlug Bernkopf 1949 eine Änderung seiner Methode dahingehend vor, daß die bebrüteten Hühnereier vor der Exembryonierung in die Allantoishöhle infiziert werden und die Kultur erst kurz vor dem Zeitpunkt der maximalen Elution angelegt wird.

Im Hauptteil der Untersuchungen wurde mit dieser Methodik gearbeitet. Es wurde wieder der gut generalisierende Stamm "Ankara" herangezogen. In mehreren Versuchsgruppen erprobten wir verschiedene Nährmedien und erzielten befriedigende Ergebnisse. Da die Exembryonierung immer nach dem Zeitpunkt der vollständigen Generalisierung vorgenommen wurde, erreichten wir je nach der Art des Nährmediums Titer von 1:50 000 bis 1:90 000. Diese Vermehrungskurven entsprechen etwa denen, die bei der Vermehrung des Vaccinevirus in der Gewebekultur erzielt werden.

Die verschiedenen Nährmedien stabilisieren das eluierte Vaccinevirus und erhalten auch die Zellen der Chorioallantoismembran länger am Leben.

VI. Zusammenfassung

Die Arbeit befaßt sich mit der Möglichkeit einer Züchtung des Vaccinevirus im exembryonierten Hühnerbrutei.

Folgende Ergebnisse wurden dabei erzielt:

1. Die für die Züchtung von Influenzavirus benutzten Verfahren sind für eine Vaccineviruszüchtung ungeeignet. Wird die isolierte Chorioallantoismembran nach dem Exembryonierungsvorgang über die Spülflüssigkeit infiziert, so erhält man keine brauchbare Virusvermehrung.
2. Eine Vaccineviruszüchtung im exembryonierten Hühnerbrutei ist nur indirekt dadurch möglich, daß die bebrüteten Hühnereier eine gewisse Zeit vor dem Exembryonieren infiziert werden. Die Chorioallantoismembran muß zum Zeitpunkt der Exembryonierung bereits generalisiert mit Virus befallen sein, damit sie in die Spülflüssigkeit Virus abgeben kann.
3. Es wurden verschiedene Nährlösungen ausgetestet, um zu brauchbaren Medien zu gelangen, die einmal die Ernährung der isolierten Membranzellen fördern, die Viruselution begünstigen und das eluierte Virus stabilisieren.
4. Die höchsten Titer, die unter optimalen Verhältnissen bei geeigneter Nährlösung und nach Infizierung der Hühnerembryonen vor der Exembryonierung in der Spülflüssigkeit erreicht wurden, bewegten sich zwischen 1:50 000 und 1:90 000.
5. Die Züchtung von Vaccinevirus im exembryonierten Hühnerbrutei bietet der Routinepraxis keine Vorteile. Sie ist nur zur Klärung spezieller Fragestellungen geeignet.

VII. L i t e r a t u r

1. W O O D R U F F, A.M. and E.W. G O O D P A S T U R E : Vaccinal Infection of the chorioallantoic membrane of the Chick embryo. Am.J.Path. 8, 271 (1932).
2. B E R N K O P F, H.: Cultivation of Influenzavirus in the chorioallantoic membrane of deembryonated eggs.
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 72, 680 (1949).
3. B E R N K O P F, H.: Study of Infectivity and hemagglutination of Influenza-Virus, propagated in deembryonated eggs.
J. Immunol. 65, 571 (1950).
4. H A N I G, M. and H. B E R N K O P F: The sedimentable components of Influenza-Virus, propagated in de-embryonated eggs.
J. Immunol. 65, 585, (1950).
5. D A N I E L S, J.B., M.D. E A T O N and M.E. P E R R Y : The effect of Glukose on the growth of Influenza-Virus in de-embryonated eggs and tissue culture.
J.Immunol. 69, 321 (1952).
6. E A T O N, M.D.: Observation on growth of Virus and the Energy-yielding Activities of the host cells.
Arch.f.Virusforsch. 5, 53 (1952).
7. S I E G E R T, R., E. M A N N W E I L E R und E.O. L D E N B U R G : Erfahrungen mit der Viruszüchtung im ex-embryonierten Brutei.
Arch. f. Hyg. 1, 265 (1954).
8. S C H Ä F E R, W., und K. M U N K: Die Vermehrung von Newcastlevirus an Hand der Hämagglutinationstiter im exembryo-nierten Brutei.
Zschr. Naturforsch. 7b, 608 (1953).

9. G R E U E L, E.: Untersuchungen über die Möglichkeit der Züchtung von Newcastlevirus auf der Chorioallantoismembran exembryonierter Hühnereier. BMTW, 70. Jahrgang, Heft 3, 51 (1957).
10. S P R Ö S S I G, M.: Versuch eines Neutralisationstestes im exembryonierten Brutei mit Influenzavirustämmen. Zbl.-Bakt. 164, 188 (1955).
11. W I L D Y, P.: The Growth of Herpes simplex Virus. Austr. J. Exper. Biol. 32, 605 (1954).
12. B U R N E T, F.M. and P.E. L I N D : Recombination of Influenza-Virus in the de-embryonated egg. Austr. J. Exper. Biol. 32, 153 (1954).
13. H E R R L I C H, A. und A. M A Y R : Die Differenzierung der Tierpockenviren im bebrüteten Hühnerei. Arch. f. Hyg. 139, 444 (1955).
14. H E R R L I C H, A. und A. M A Y R : Die Viruszüchtung im bebrüteten Hühnerei. Röntgen-Laborat.praxis, Stuttgart 1955, S. 99, 1955, S. 259.
15. B U R N E T, F.M. and F E R I S : The technique of quantitative chorioallantoic virus titration. J. Bact. Baltimore 44, 241 (1942).
16. L A H E L L E, O. and F.L. H O R S E F A L L : Multiplication of Influenza-Virus in dead Chick embryos. Proc. Soc. Exper. Biol. 70, 547 (1949).

Lebenslauf

Am 29. Mai 1930 in Plochingen am Neckar geboren, besuchte ich in Notzingen 4 Klassen Volksschule. 1941 trat ich in die Oberschule in Kirchheim/Teck ein und legte 1950 mein Abitur ab.

Mit dem Studium der Veterinärmedizin begann ich im Sommersemester 1952 in München und beendete es mit dem Abschluß der Tierärztlichen Prüfung am 18. Dezember 1956.

